

アミノ酸配列を単純化した BPTI の精製改良および熱力学的安定性の解析		
黒田研究室	学籍番号：09251025	清水 凌

### 【背景・目的】

タンパク質を産業利用する際、本来存在する生体内とは異なる過酷な環境下で利用することがほとんどであり、タンパク質の種類によっては機能の低下が見られることが少なくない。そのため、タンパク質の安定性（タンパク質の構造をいかに維持させるか）がタンパク質工学において重要な課題である。本研究では、58 残基中多数のアミノ酸を同時にアラニン置換することでアミノ酸配列を単純化したウシ膵臓トリプシン阻害タンパク質 (BPTI) 変異体の構造と安定性を調べることを目的としている。先行研究において、立体構造を変えずに野生型 BPTI の 3 本のジスルフィド中 1 本のみを残した BPTI-[5,55]A14GA38V（アラニンを 8 個含む）を標準型として、BPTI-25（アラニンを 25 個含む）までの変異体がアラニンの個数に相関しながらエンタルピー安定化していたことが報告されている。更なるエンタルピー安定化が期待された BPTI-26、-27（アラニンを 26、27 個含む）の熱力学的解析を行うため、本研究ではこれらの精製法の改良、熱安定性の評価、ならびに結晶化の試みについて報告する。

### 【研究方法】

BPTI 変異体を大腸菌で発現させ、BPTI を Trp タグから CNBr 切断し、分取用逆相 HPLC にかけて。分取用逆相 HPLC 後のサンプルに Trp タグが含まれており、20mM Tris-HCl pH8.7 で透析後、等電点沈殿を行い、分析用逆相 HPLC にかけて純度を確認した。また、アラニンの含量の増加で BPTI-26、-27 が透析中に凝集しやすくなったため、凝集したタンパク質に 6M Gdn-HCl と 100mM DTT を加え、リフォールディングを行い、凝集画分からの BPTI 回収および分析用逆相 HPLC ピークを確認した。円偏光二色性分光法 (CD) による熱変性曲線を用いて BPTI 変異体の安定性を評価した。その後ハンギングドロップ法で結晶化を行った。

### 【結果及び考察】

BPTI-25 までの変異体は分析用逆相 HPLC でシングルピークが観測され、結晶化に最適な純度であることが確認されている。アラニン置換することで BPTI 変異体の疎水性の度合いが変化し、Trp タグと BPTI-26、-27 の HPLC ピークが重なったが、pH8.7 で等電点沈殿することで高純度のタンパク質が得られた。また、凝集した BPTI 変異体をリフォールディングさせたことで、上清画分で回収できた (図 1)。それを逆相分析用 HPLC にかけると、シングルピークが得られた。

先行研究でエンタルピー安定化が述べられていた BPTI-25 および BPTI-26、-27 の CD による熱変性曲線を比較すると、熱安定性が大幅に低下していた (図 2)。今回用いた BPTI-26 はヘリックス中の 52 残基目のロイシンを、BPTI-27 はさらに 6 残基目のロイシンをアラニンに置換しており、その周辺で起きた極所的な構造変化が不安定化を招いたと考えられ、BPTI-26、-27 の結晶化を試みた。100 $\mu$ m 程度の結晶を得ることは成功したが、構造解析ができるほどの結晶を得るには至らなかった。以上の熱変性曲線が 2 状態であること、および結晶化したことから 26 個及び 27 個のアラニンを含む BPTI-26、-27 が天然構造を維持していることが明らかとなった。その上、天然配列が持つ構造形成に関する情報の冗長性が大きいことが示唆された。この冗長性を持つ配列に対して、溶解度及び安定性の向上を目的とした置換が期待される。

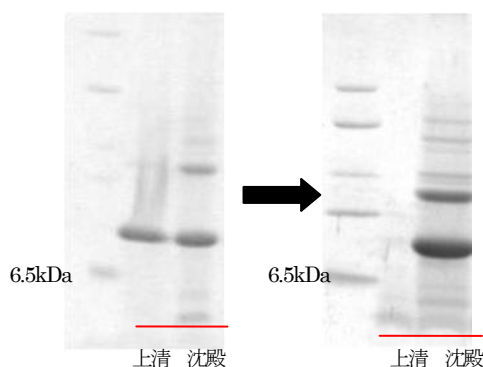


図 1 リフォールディング前、後

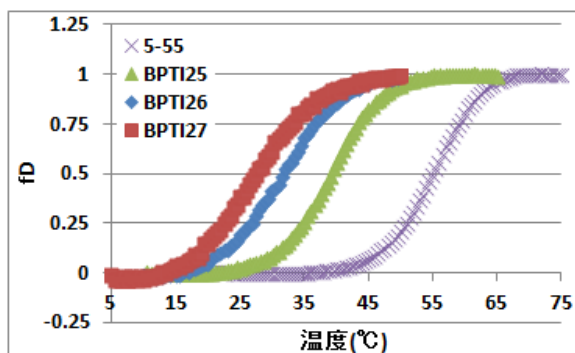


図 2 BPTI 変異体の熱変性曲線